

09/463890



|       |             |
|-------|-------------|
| REC'D | 19 OCT 1998 |
| WIPO  | PCT         |

## Bescheinigung

Herr Professor Ulrich H. K o s z i n o w s k i in  
München/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der  
Bezeichnung

"Verfahren zur Klonierung eines großen Virusge-  
noms"

am 1. August 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue  
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-  
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 12 N und A 61 K der Internationalen Patentklassifika-  
tion erhalten.

München, den 13. August 1998  
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Wallner

Patenzzeichen: 197 33 364.8

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

## Verfahren zur Klonierung eines großen Virusgenoms

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klonierung von großen viralen DNA-Genomen. Die klonierten Virusgenome sind infektiös, d.h. aus der klonierten DNA können durch geeignete Verfahren infektiöse Viren (oder Viruspartikel) wiederhergestellt werden. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein künstliches zirkuläres Chromosom, das durch ein solches Verfahren erhältlich ist, sowie seine Verwendung und ein Verfahren zur Mutagenese von großen viralen Genomen unter Verwendung des künstlichen zirkulären Chromosoms.

Es gibt eine Reihe großer viraler Genome, die so groß sind, daß es schwierig ist, sie zu klonieren, zu analysieren und eine gezielte Mutagenese durchzuführen. Dies liegt unter anderem daran, daß die bis jetzt verwendeten Verfahren auf die Verwendung mehrfacher Rekombinationsschritte in eukaryontischen Zellen angewiesen sind, die 1. selten, 2. fehleranfällig und 3. praktisch nicht zu kontrollieren sind. Dadurch werden aufwendige Selektionsverfahren notwendig, um gewünschte Mutanten zu isolieren und charakterisieren zu können.

Verschiedene Viren mit großer DNA sind wichtige Pathogene, entweder für den Menschen oder für Tiere oder Pflanzen, wobei sie zum Teil zu schweren oder sogar tödlichen Krankheiten führen. Beispielhaft sei hier das Cytomegalievirus (CMV) genannt, das zu den wichtigen menschlichen pathogenen Viren zählt; mit einer hohen Prävalenz, die zu schweren Krankheiten führt, insbesondere bei immunologisch unreifen Patienten oder bei Patienten mit einem beeinträchtigten Immunsystem (1). Da das menschliche Cytomegalievirus und das Maus-Cytomegalievirus (MCMV) eine Reihe von Ähnlichkeiten in ihrer Biologie und Pathogenese zeigen (2), wurde die Infektion von Mäusen mit MCMV zu einem intensiv untersuchten in vivo-Modell zur Untersuchung der Pathogenese der CMV-Infektion. Die 235 kb-Genome von sowohl menschlichem als auch Mäuse-CMV sind die größten Genome von DNA-Viren der Säuger. Die Sequenzanalyse der menschlichen und Mäuse-CMV-Genome zeigt eine ähnliche genetische Organi-

sation und eine Kodierungsfähigkeit für vermutlich mehr als 220 Polypeptide (3, 4, 5).

Informationen über die Funktion eines Großteils der CMV-Genprodukte liegen aufgrund der Größe der viralen DNA und der damit verbundenen schwierigen Manipulierbarkeit des viralen Genoms nach wie vor kaum vor. Dies steht z.B. im Gegensatz zu der Situation beim Herpes simplex Virus ( $\alpha$ -Herpesviren) (6), das eingehend untersucht wurde und für das viele virale Genfunktionen erklärt werden können. Es besteht deshalb ein Bedarf an CMV-Klonen und CMV-Mutanten, da diese aufgrund ihrer großen DNA und ihrer langsamen Replikationskinetik bisher nur sehr schwierig zu erhalten sind.

Entsprechend besteht auch ein Bedarf an Klonierungsverfahren für andere große Virus-Genome, insbesondere Herpesvirusgenome, die dieselbe Problematik aufweisen, wie die oben beispielhaft für CMV beschriebene.

Für die Unterbrechung und Deletion von CMV-Genen wurde ein Verfahren zur Insertionsmutagenese entwickelt (7, 8). Aufgrund der geringen Häufigkeit homologer Rekombinationen in eukaryontischen Zellen ist das Verfahren jedoch sehr ineffektiv. Zusätzlich wurden häufig zufällige Deletionen und die Bildung nicht erwünschter rekombinanter Viren beobachtet (7, 9). Obwohl Selektionsverfahren dieses ursprüngliche Verfahren verbessert haben (9, 10, 11), bleibt die Erzeugung von CMV-Mutanten eine aufwendige und häufig erfolglose Aufgabe. Kürzlich konnte ein Verfahren zur Konstruktion von rekombinanten Herpesviren aus klonierten, überlappenden Fragmenten (12) auch auf CMV ausgedehnt werden (13). Dies ist bereits eine deutliche Verbesserung gegenüber den oben beschriebenen Verfahren, da dieses Verfahren nur rekombinante Viren erzeugt und eine Selektion gegen nicht rekombinante Wildtypviren überflüssig macht. Die resultierenden Mutanten sind jedoch immer noch das Produkt mehrerer Rekombinationseignisse in eukaryontischen Zellen, die schwierig zu kontrollieren sind. Ein korrekter Wiederaufbau des viralen Genoms kann nur nach Wachstum und Isolierung der Virusmutante sichergestellt werden.

Es bestand daher immer noch ein Bedarf, ein Verfahren zur Klonierung großer, möglichst vollständiger, auf jeden Fall aber replikationsfähiger (sogenannter "infektiöser") Virusgenome bereitzustellen, das möglichst wenige Rekombinationsschritte in eukaryontischen Zellen benötigt und bei dem daher eine Isolierung und Selektion der Rekombinanten und ihre Selektion überflüssig wird.

Diese Aufgabe wird durch das in Anspruch 1 genannte Verfahren gelöst. Vorteilhaftige Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die Aufgabe wird gemäß der vorliegenden Erfindung dadurch gelöst, daß ein Verfahren zum Klonieren eines großen Virusgenoms bereitgestellt wird, umfassend die Schritte

- a) Einbringen einer Sequenz (1), enthaltend Sequenzen eines Klonierungsvehikels, in eine Zelle, enthaltend das zu klonierende Virusgenom, und
- b) Rekombinieren der Sequenz (1) aus Schritt a) mit dem zu klonierenden *DNA-Fragment* vorzugsweise über homologe Rekombination, so daß ein künstliches zirkuläres Chromosom entsteht.

Die homologe Rekombination kann beispielsweise dadurch herbeigeführt werden, daß die Sequenz (1) Abschnitte enthält, die homolog sind zu der zu klonierenden DNA.

Das Verfahren ist insbesondere für solche Virusgenome geeignet, die größer als 100 kb (vorzugsweise größer als 200 kb) sind. Besonders interessant ist das Verfahren für eine Klonierung großer viraler DNA, wie z.B. der DNA von Herpesviren, wobei besonders das menschliche Cytomegalievirus und das Maus-Cytomegalievirus genannt werden sollen. Diese Viren sind wichtige Pathogene für den Menschen und ihre Klonierung und darauffolgende Mutagenese wird erst durch das erfindungsgemäße Verfahren möglich gemacht. Weitere geeignete

Virusgenome sind die von anderen DNA-Viren bzw. alle Herpesvirusgenome (Herpes simplex Virus Typ 1 und 2, Epstein-Barr-Virus, Varizella Zoster, humane Herpesviren 6, 7, 8 (HHV6, HHV7, HHV8), Herpesviren der Tiere, z.B. Pseudorabies-Virus, Bovine Herpesviren 1, 2, 3, 4.

Vorzugsweise werden als Wirtszellen für den Schritt a) des Anspruchs 1 eukaryontische Zellen verwendet, vorzugsweise Säugerzellen, Insektenzellen oder Hefezellen, wobei insbesondere primäre Fibroblasten vom Menschen (z.B. humane Vorhautfibroblasten (HFF)) und der Maus (z.B. Fibroblasten von (BALB/c)-Mäusen) oder NIH3T3-Fibroblasten (ATCC CRL1658) verwendet werden können.

Die Einbringung der Sequenz (1) in die eukaryontischen Zellen erfolgt durch ein Calciumpräzipitationsverfahren oder Elektroporation oder Lipofektion oder mit Verfahren nach dem neuesten Stand der Technik. Vorzugsweise ist die Sequenz (1) aus Schritt a) von loxP-Stellen oder einmaligen (uniquen) Restriktionsschnittstellen flankiert, was ihr späteres Herausschneiden durch die Rekombinase Cre oder Restriktionsenzyme möglich macht. Gegebenenfalls kann die zu klonierende Virus-DNA ebenfalls zunächst in eine geeignete Zelle eingebracht werden, falls die sie enthaltende Zelle für die Klonierung ungeeignet sein sollte.

In einem weiteren Schritt wird das erhaltene Chromosom gemäß dem vorstehenden Verfahren in Bakterien wie E. coli eingebracht werden. Dieses Einbringen kann z.B. durch Elektroporation oder jedes andere im Stand der Technik bekannte Verfahren geschehen. Vorzugsweise ist das Klonierungsvehikel ein Plasmid, z.B. das Plasmid pRP2 oder pRP3, wie unten beschrieben. Es ist jedes Vehikel geeignet, das zusammen mit der zu klonierenden DNA ein künstliches Ringchromosom, wie beispielsweise ein bakterielles Chromosom (BAC), ausbilden kann. Geeignete Klonierungsvehikel sind low-copy-Vektoren, da nur durch die niedrige Kopienzahl der Plasmide die Stabilität der klonierten DNA gewährleistet ist. Weitere geeignete Vehikel sind Derivate, die sich von den bekannten Mini-F-Plasmiden von E. coli ableiten. Das Mini-F-Plasmid enthält die bakteriellen Gene (Funktionen) repE (für die Replikation), parA, B, C (für die Verteilung des

Plasmids auf Tochterbakterien und die strikte Kontrolle der Kopienzahl) ovis (origin of replication; für die Replikation).

Die Erfindung betrifft weiterhin ein künstliches zirkuläres Chromosom, das durch eins oder mehrere der in den Ansprüchen 1 bis 14 beschriebenen Verfahren erhältlich ist. Bevorzugt ist das künstliche zirkuläre Chromosom bakteriell und enthält die gesamte DNA-Sequenz eines Virus, die für dessen Vermehrung essentiell ist, sowie die Sequenz (1) aus Schritt a) des Anspruchs 1.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das künstliche zirkuläre Chromosom die DNA-Sequenz von Herpesviren, besonders bevorzugt die DNA-Sequenz des menschlichen Cytomegalievirus oder die DNA-Sequenz des Maus-Cytomegalievirus und ein Antibiotika-Resistenzgen.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines künstlichen zirkulären Chromosoms, das durch die vorher beschriebenen Verfahren erhältlich ist, für die Mutagenese großer viraler DNA-Genome, insbesondere die Insertion therapeutisch wichtiger Gene und die Herstellung von Vektoren für die somatische Gentherapie.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Mutagenese großer Virusgenome, umfassend die Schritte

- A) Klonierung eines großen Virusgenoms gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14;
- B) Einbringen des erhaltenen künstlichen Chromosoms in eine bakterielle Wirtszelle oder in Hefe; und
- C) homologe Rekombination des Chromosoms in Bakterien oder in Hefe mit einem mutanten Allel.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Zellen, die ein künstliches zirkuläres Chromosom der o.g. Art enthalten.

Die künstlichen zirkulären Chromosomen eignen sich weiterhin für einen gentherapeutischen Einsatz bzw. als Bestandteil eines Impfstoffs.

Dabei beschreiben die Figuren die vorliegende Erfindung im einzelnen.

Figur 1 zeigt die Strategie zur Klonierung und Mutagenese eines großen Virusgenoms.

(A) Ein großes virales Genom und ein Rekombinationsplasmid mit bakteriellen Vektorsequenzen wurde in eukaryontische Zellen eingebracht, um eine rekombinante DNA (BAC) zu erzeugen. Dies kann durch verschiedene Verfahren erfolgen, z.B. Infektion, Transfektion, Elektroporation usw. Zirkuläre DNA wurde aus den infizierten Zellen isoliert und in E. coli übertragen. (B) Eine Mutagenese des BAC wurde in E. coli durch homologe Rekombination mit einem mutanten Allel durchgeführt, und das mutierte BAC wurde in eukaryontische Zellen transfiziert, um rekombinante Virus-Genome bzw. Viren zu rekonstituieren (C).

Figur 2 zeigt die Herstellung und den Aufbau der MCMV künstlichen bakteriellen Chromosome (BACs) pSM3 (a) und pSM4 (b) und die Struktur der abgeleiteten Rekombinanten MC96.73 und MC96.74. Die EcoRI-Restriktionskarte des rechten terminalen Endes des Genoms des MCMV-Stamms Smith ist oben dargestellt. Die Rekombinationsplasmide pRP2 und pRP3 enthalten 2.2 und 6.6 kb flankierender MCMV homologer Sequenzen (weiße Kästen), den BAC-Vektor (grau) und das gpt-Gen (schraffiert), flankiert von loxP-Stellen (schwarz). Die EcoRI-Restriktionskarte der BACs pSM3 und pSM4 ist darunter dargestellt. Die terminalen EcoRI-Fragmente des MCMV-Genoms sind in den BAC-Plasmiden pSM3 und pSM4 fusioniert, was zu neuen Fragmenten von 22,9 bzw. 24,3 kb führt. Die linearen Genome der rekombinanten Viren MC96.73 und MC96.74 enthalten ter-

minale EcoRI-Fragmente mit einer Länge von 12,3 bzw. 13,7 kb. Zusätzliche Restriktionsenzymstellen sind mit BamHI (B), HindIII (H) und SfiI (S) angegeben.

Figur 3 zeigt die Strukturanalyse der künstlichen bakteriellen Chromosome (BACs) pSM3 und pSM4 (a) und der rekonstituierten Virusgenome (b, c). (a) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel von EcoRI-verdauten BACs, die aus *E. coli*-Kulturen isoliert wurden (Spuren pSM3 und pSM4) und von Wildtyp-MCMV-DNA, isoliert aus gereinigten Virionen (Spur wt). (b) Restriktionsenzymanalyse der viralen MC96.73- und MC96.74-Genome. Die BACs pSM3 und pSM4 wurden in Maus-Embryonenfibroblasten transfiziert und der Überstand der transfizierten Zellen wurde verwendet, um neue Zellen zu infizieren. Die DNA, die aus den infizierten Zellen isoliert wurde und Wildtyp-MCMV-DNA wurde mit EcoRI verdaut und durch Elektrophorese auf 0,6 % Agarosegelen 14 Stunden aufgetrennt. Die EcoRI-O(O) und die Vektorfragmente (v) sind angegeben und die Größe der zusätzlichen Banden ist links gezeigt. (c) Trennung der EcoRI-Fragmente, die in (b) dargestellt sind, nach Elektrophorese für 28 Stunden.

Figur 4 zeigt die Konstruktion der MCMV-ie1-Mutante MM96.01 (a), die Strukturanalyse des mutierten künstlichen bakteriellen Chromosoms (BACs) (b) und des Genoms der ie1-Mutanten MM96.01 (c). (a) Die HindIII-Schnittstelle zwischen den HindIII-K- und -L-Fragmenten des Genoms des MCMV-Stamms Smith (oben) wurde unter Verwendung des EcoRI-HpaI-Fragments (schraffierter Bereich) durch Mutagenese entfernt. Die Exon-Intron-Struktur der ie1- und ie3-Gene ist angezeigt und die proteinkodierenden Sequenzen sind als schraffierte Kästchen dargestellt. Die Mutation führt zu einer Rasterverschiebung nach 273 Codons und der Bildung eines neuen Stoppcodons nach zusätzlichen 9 Codons (schwarzer Kasten). Der offene Kasten bezeichnet den Teil des offenen ie1-Leserahmens, der im mutierten Virus nicht translatiert wird. (b) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel des mit HindIII verdauten Eltern-BACs pSM3 und des mutierten BACs pSMie1. (c) HindIII-Muster der Genome des rekombinanten Virus MC96.73 und des ie1-Mutanten MM96.01. Das HindIII-K- und -L-Fragment und das neue 15,2



kb-Fragment sind links angegeben und die Größe einiger HindIII-Fragmente ist am rechten Bildrand angegeben.

Figur 5 zeigt die Abwesenheit von pp89 in Zellen, die mit dem ie1-Mutanten MM96.01 infiziert sind. Embryonale Maus-Fibroblasten (MEF) waren entweder nicht infiziert, infiziert mit dem rekombinanten Virus MC96.73 oder mit der ie1-Mutanten MM96.01 in Gegenwart von Cycloheximid (50 µg/ml) für 3 Stunden, um eine selektive Expression der immediate-early Proteine zu erzielen (16). Nach Entfernung des Cycloheximids wurde Actinomycin D (5 µg/ml) hinzugefügt und die Proteine wurden mit <sup>35</sup>S-Methionin (1200 ci/mmol) für zusätzliche 3 Stunden markiert. Die Lyse der Zellen und Immunopräzipitationen wurden wie beschrieben durchgeführt (28) unter Verwendung von Antiserum 3/1, das gegen den C-Terminus des ie1-Proteins pp89 gerichtet war (a) und des ie1/ie3-spezifischen Antipeptidserums b5-1 (b) (16,28). Eine lange Belichtung des Autoradiogramms (b) ist in (c) dargestellt.

Im folgenden wird die Erfindung im Hinblick auf die Beispiele und Figuren im einzelnen beschrieben.

#### Beispiel 1: Herstellung der Viren und Zellen

Die Vermehrung von MCMV (Stamm Smith, ATCC VR-194, ATCC, Rockville, Md.) in BALB/c embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF-) und NIH3T3-Fibroblasten; (ATCC CRL1658) wurde bereits früher beschrieben (14,15). Rekombinante Viren wurden entsprechend veröffentlichten Arbeitsvorschriften erzeugt (8, 9, 15). Um die Virusnachkommenschaft aus künstlichen bakteriellen Chromosomen (BACs) herzustellen, wurden BACs (ca. 0,5-1 µg) in MEF transfiziert, indem das Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren verwendet wurde, wie beschrieben in (15, 16).

#### Beispiel 2: Isolierung viraler DNA und von BACs

Plasmidklonierungen werden nach Standardverfahren durchgeführt (20). Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs (Bevety, MA) gekauft. Wildtyp-MCMV-DNA wurde aus Virionen hergestellt und Gesamt-Zell-DNA wurde aus infizierten Zellen isoliert, wie bereits früher beschrieben (14, 17). Zirkuläre Virus-DNA wurde durch das Verfahren von Hirt (18) isoliert und in elektrokompente *E. coli*-DH10B-Stämme elektroporiert (19). BACs wurden aus *E. coli*-Kulturen isoliert unter Verwendung eines alkalischen Lyseverfahrens (20) und weiter durch Präzipitation mit Polyethylenglycol gereinigt (20).

### Beispiel 3: Plasmide und Mutagenese

Für die Konstruktion der Rekombinationsplasmide pRP2 und pRP3 wurde ein 17 kb-HindIII-BamHI-Subfragment des MCMV-HindIII-E'-Fragments (17) in pACYC177 (21) subkloniert. Die EcoRI-Fragmente O, b, f und g innerhalb des HindIII-E'-Fragments (14, siehe Figur 2), wurden deletiert und ein EcoRI-NotI-Adapter wurde hinzugefügt, um das Plasmid pHE' $\Delta$ E zu erzeugen. Das *E. coli*-Guaninphosphoribosyltransferase(gpt)-Gen, gesteuert von dem Herpes simplex-Thymidinkinase-Promotor und gefolgt von der SV40 frühen Polyadenylierungsstelle wurde auf einer Seite mit einer Tandem-loxP-Stelle flankiert und dann in das Plasmid pKSO, einem Derivat des BAC-Vektors pBAC108L (19) mit modifiziertem Polylinker (PmeI-NsiI-PacI-BamHI-PmeI-AscI) kloniert, nachdem es zunächst in eine BamHI-Stelle inseriert worden war, die zwischen Tandem-loxP-Stellen lag und zuvor in p Bluescript KS+ (Stratagene) kloniert worden war. Das pKSO-gpt-Plasmid wurde mit NotI zwischen den beiden loxP-Stellen linearisiert und in die einzige NotI-Stelle des Plasmids pHE' $\Delta$ E inseriert. pRP2 und pRP3 unterscheiden sich in der Orientierung der pKSO-gpt-Sequenz (Figur 2).

Um das Mutagenesepiasmid pMieFS zu konstruieren, wurde ein 7,2 kb HpaI-EcoRI-Fragment (Figur 4a) des Plasmids pIE111 (23) in das Plasmid pMBO96 (24) inseriert, und die HindIII-Stelle des Inserts wurde durch Behandlung mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt und zerstört. Die Mutagenese des MCMV-BACs

wurde durch homologe Rekombination in dem E. coli-Stamm CBTS (25) entsprechend veröffentlichten Arbeitsvorschriften (24, 25) durchgeführt.

#### Beispiel 4: Strategie zur Klonierung und Mutagenese des MCMV-Genoms

Die bekannten Verfahren zur Manipulation von CMV-Genomen und anderen großen Virusgenomen sind nur begrenzt anwendbar bzw. erfolgreich, da sie auf homologer Rekombination in eukaryontischen Zellen basieren. Um das MCMV-Genom und andere große Virusgenome einer Mutagenese besser zugänglich zu machen, wurden infektiöse künstliche bakterielle Chromosomen (BAC) des MCMV in E. coli erzeugt. Die in Figur 1 dargestellte Strategie wurde zur Klonierung des MCMV-Genoms verwendet, da Herpesviren ihr Genom nach dem Eintritt in die Zelle zirkularisieren (6, 26) und da plasmidähnliche zirkuläre Intermediate früh im Replikationszyklus von Herpesviren auftreten (27). In einem ersten Schritt wurde ein rekombinantes Virus erzeugt, das einen bakteriellen Vektor integriert in seinem Genom enthielt. Nach Selektion des rekombinanten Virus unter Verwendung des Selektionsmarkers Guaninphosphoribosyltransferase(gpt) (9) häufen sich zirkuläre Intermediate in infizierten Zellen an. Nach Isolierung und Elektroporation der zirkulären Intermediate in E. coli ist das CMV-BAC der gesamten Gentechnologie zugänglich, die in Verbindung mit E. coli verwendet wird. Die Transfektion des mutierten BACs in eukaryontische Zellen sollte schließlich virale Mutanten rekonstituieren (Figur 1).

#### Beispiel 5: Erzeugung rekombinanter Viren und BACs

Wir konnten bereits früher zeigen, daß ein großer Bereich am rechten terminalen Ende des MCMV-Genoms nicht essentiell für die Replikation *in vitro* ist (18). Daher wurde dieser Bereich für eine Integration des BAC-Vektors und des Selektionsmarkers gpt (Figur 2a, b) gewählt. Um zu untersuchen, ob die Integration des BAC-Vektors in das virale Genom in beiden Orientierungen möglich war, wurden zwei unterschiedliche Rekombinationsplasmide pRP2 und pRP3 hergestellt (Figur 2a, b). Für die Herstellung des BAC-haltigen Virusgenoms wurde das re-

kombinante Virus  $\Delta$ MC95.21 verwendet, das eine lacZ-Insertion im EcoRI-O-Fragment seines Genoms aufweist. Dies ermöglichte die Identifizierung von Integrationsereignissen, indem ein Screening auf weiße Plaques nach Färbung mit 5-Brom-3-chlorindolyl- $\beta$ -galactopyranosid (X-Gal) durchgeführt wurde. Rekombinante Viren mit integrierten Vektorsequenzen wurden unter Verwendung des gpt-Markers angereichert, und schließlich wurde eine zirkuläre Virus-DNA aus infizierten Zellen isoliert und in E. coli elektroporiert.

Eine hohe Prozentzahl bakterieller Klone (ca. 80%) enthielten die erwarteten vollständigen Plasmide. Im Vergleich mit aus MCMV-Virions isolierter DNA enthielten die BACs pSM3 und pSM4 zusätzliche EcoRI-Fragmente mit einer Länge von 22,9 bzw. 24,3 kb (Figur 3a), abhängig von der Orientierung des integrierten Vektors (Figur 2a, b). Die zusätzlichen Banden ergaben sich aus der Fusion der terminalen EcoRI-Fragmente, was die zirkuläre Natur der BACs (Figur 2) anzeigte; wie erwartet fehlt das 5,7 kb-EcoRI-O-Fragment in den BACs (siehe Figur 2 und 3a), und die Vektorsequenzen führten zu einer Doppelbande bei 6,4 kb (als v in Figur 3a bezeichnet). Bei dem BAC pSM3 war das 2,5 kb-EcoRI Z-Fragment um 1,4 kb der gpt- und Vektorsequenzen vergrößert, was zu einem 3,85 kb-Fragment führte (Figur 3, Bande pSM3). Eine Southern-Blot-Analyse und Charakterisierung der BACs mit Restriktionsenzymen HindIII, XbaI und BamHI (Daten nicht dargestellt) bestätigten die erfolgreiche Klonierung des gesamten Genoms dieser MCMV-Rekombinanten in E. coli.

#### Beispiel 6: Rekonstituierung (Wiederherstellung) der Virusnachkommenschaft aus MCMV-BACs

Die Transfektion der BACs pSM3 und pSM4 in embryonale Maus-Fibroblasten führten zu der Entwicklung von Plaques. Neue Zellen wurden mit dem Überstand von pSM3 und pSM4 transfizierten Zellen infiziert. Gesamtzell-DNA wurde isoliert, als die Zellen einen vollständigen cytopathischen Effekt zeigten. Die EcoRI-Spaltung der isolierten DNA führte zu einem ähnlichen Muster wie die Spaltung der BACs pSM3 und pSM4 (vgl. Banden MC96.73 und MC96.74 in Figur 3b und

Banden pSM3 und pSM4 in Figur 3a). DNA, die aus infizierten Zellen isoliert wird, enthält zirkuläre, konkatemäre und lineare virale DNA, die bereits in Kapside verpackt war. Daher war die Menge der 22,9 und 24,3 kb-Fragmente, die sich aus der Fusion der terminalen EcoRI-Fragmente ergab, submolar (Figur 3b, Banden MC96.73 und MC96.74). Außerdem tauchten die terminalen EcoRI-Fragmente, die von linearen Genomen abstammten, wieder auf. Das terminale EcoRI-Fragment F (12,3 kb) wurde in dem Genom der Rekombinanten MC96.73 wie auch im Wildtyp MCMV entdeckt (Figur 3c, Banden MC96.73 und wt). Bei der Rekombinanten MC96.74 war das terminale EcoRI-Fragment F um eine 1,4 kb-Vektorsequenz (siehe Figur 2b) vergrößert, was zu einer Doppelbande bei 13,7 kb führte (Figur 3c, Bande MC96.74). Verdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI ergab alle erwarteten Banden (Daten nicht dargestellt). Damit wurde erreicht, daß CMV-Rekombinanten aus einem großen Plasmid ohne irgendeine Manipulation vor der Transfektion hergestellt werden können.

Beispiel 7: Konstruktion einer MCMV-ie1-Mutanten durch homologe Rekombination in E. coli

Um die Wirksamkeit der gezielten Mutagenese in E. coli zu überprüfen, wurde eine kleine Mutation in die (immediate-early) (IE) Region des MCMV-Genoms eingeführt. Mindestens zwei alternativ gespleißte Transkripte ergeben sich aus der IE-Region (Figur 4a), die das 89 kDa-ie1-Protein und das 88 kDa-ie3-Protein kodieren (16). Aufgrund der komplexen Struktur der ie1/ie3-Transkriptionseinheit ist die Unterbrechung des ie1-Gens durch konventionelle Rekombinationsverfahrens vermutlich schwierig zu erreichen, ohne das die Expression des ie3-Gens beeinflusst wird. Daher war nicht bekannt, ob das MCMV-ie1-Protein für die Virusreplikation essentiell ist. Um den ie1-Leserahmen (595 Kodons) zu unterbrechen, wurde eine Leserahmen-Mutation an einer HindIII-Stelle in Exon 4 des ie1-Gens eingeführt. Die Mutation beendete den ursprünglichen Leserahmen nach Kodon 273 und erzeugte ein neues Stoppkodon nach zusätzlichen 9 Kodons (Figur 4a). Die Mutation wurde auf einem 7,4 kb-EcoRI-HpaI-Fragment (Figur 1a) konstruiert und anschließend auf das BAC pSM3 durch homologe Rekombination in E. coli

unter Verwendung einer zweistufigen Austauschstrategie übertragen (24, 25). Das Mutageneseverfahren führte zu einem Verlust der HindIII-K- und -L-Fragmente und der Erzeugung eines neuen 15,2 kb-Fragments (Figur 4b). Die EcoRI- und BamHI-Muster der BACs waren unverändert (Daten nicht dargestellt), was bestätigte, daß die BACs während des Mutageneseverfahrens stabil blieben. Die Transfektion des mutierten BACs pSM4-ie in MEF führte zu Plaquebildung. Gesamzell-DNA wurde aus infizierten Zellen isoliert und durch Hind-III-Verdauung analysiert. Wie erwartet, waren die HindIII-K- und -L-Fragmente durch das 15,2 kb-Fragment im Genom des ie1-Mutantenvirus MM96.01 ersetzt worden (Figur 4c). Offensichtlich wurde die Mutation, die in das MCMV-BAC eingeführt worden war, nach Rekonstitution des Mutantenvirus beibehalten.

Die Abwesenheit des ie1-Proteins in infizierten MM96.01-Zellen wurde durch Immunpräzipitation bestätigt. Ein Antiserum, das gegen den Carboxyterminus des ie1-Proteins gerichtet war, spürte das ie1-Protein in Lysaten von MC96.73 infizierten Zellen auf, präzipitierte aber keine Proteine aus Lysaten von MM96.01 infizierten Zellen (Figur 5a). Ein ie1/ie3-spezifisches Antiserum, B5/1, (16, 28) spürte 2 Proteine von 89 und 88 kDa in Lysaten von MC96.73 infizierten Zellen auf und 1 Protein von 88 kDa in Lysaten von MM96.01 infizierten Zellen (Figur 5b). In der MM96.01-Spur fehlte das 89 kDa-ie1-Protein eindeutig und es wurde nur das 88 kDa-ie3-Protein nachgewiesen (Figur 5b). Eine längere Belichtung des Autoradiogramms zeigte ein 36 kDa-Protein in MM96.01 infizierten Zellen (Figur 5c). Das anscheinende Molekulargewicht dieses Polypeptids stimmt mit der erwarteten Molekularmasse des verkürzten ie1-Proteins und mit dem Wanderungsverhalten verschiedener mutierter ie1-Proteine überein (28).

Wir schlossen daraus, daß das ie1-Protein pp89 für eine Replikation des ie-Mutanten MM96.01 nicht notwendig ist.

#### Beispiel 8: Mutageneseverfahren

Folgend den veröffentlichten Arbeitsvorschriften von O'Connor et al. (24) und Kempkes et al. (25) wurde die Mutagenese des MCMV-BACs durch homologe Rekombination in dem E. coli-Stamm CBTS durchgeführt, der ein recA-Allel und einen temperaturempfindlichen Suppressor trägt (25). Das BAC-pSM3 und das Shuttleplasmid pMieFS wurden aufeinanderfolgend in E. coli-CBTS elektroporiert und Klone, die Kointegrate enthielten, wurden bei 42°C auf Agarplatten mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) und Tetracyclin (10 µg/ml) selektiert. Die Kointegrate wurden durch Restriktionsenzymanalyse auf die gewünschten Strukturen untersucht. Die Auflösung der Kointegrate wurde durch Inkubation der bakteriellen Klone bei 30°C auf Agarplatten nur mit Chloramphenicol ermöglicht. Die Plasmide wurden durch Screening von Tetracyclin-empfindlichen Klonen identifiziert und durch HindIII-Spaltung analysiert, um zu bestimmen, ob eine Mutation erreicht worden war, oder ob eine Rückkehr zu der Elternsequenz aufgetreten war.

#### Beispiel 9: Konstruktion rekombinater MCMV

Rekombinante Viren wurden entweder durch Kotransfektion von viraler DNA und dem linearisierten Rekombinationsplasmid, wie vorher beschrieben (8, 15), oder durch Elektroporation des Rekombinationsplasmids in NIH3T3-Zellen unter Verwendung des BioRad Genpulsers (250 V, 960 µF), gefolgt von einer Superinfektion mit MCMV 8 Stunden später, erzeugt. Rekombinante Viren wurden mit Mycophenolsäure und Xanthin entsprechend veröffentlichter Arbeitsvorschriften (9) selektiert.

#### Beispiel 10: Isolierung viraler DNA

Wildtyp-MCMV-DNA wurde aus Virionen hergestellt und durch CsCl-Gradientenzentrifugation gereinigt, wie vorher beschrieben (14). Für eine Charakterisierung der rekonstituierten Genome wurde die Gesamtzell-DNA aus infizierten Zellen isoliert. Die Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet, gefolgt von einer Zentrifugation bei 800 g für 5 Minuten und in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 0,5 % SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K lysiert. Nach 12-stündiger Inkubation bei

56°C wurde die DNA zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:48:2) extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Die DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese auf einem 0,6 % Agarosegel aufgetrennt, wie vorher beschrieben (14).

Zirkuläre Virus-DNA wurde durch das Verfahren von Hirt (18) isoliert. Infizierte Zellen aus 60 mm Gewebekulturschale wurden in 1 ml Puffer A lysiert (0,6 % SDS, 10 mM EDTA pH 7,5) und 0,66 ml 5 M NaCl wurden hinzugefügt, gefolgt von einer Inkubation bei 4°C für 24 Stunden. Die Probe wurde bei 15000 g bei 4°C 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde mit Phenol extrahiert und die DNA wurde mit Ethanol ausgefällt. Die DNA wurde wieder in 30 µl TE gelöst (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) und gegen TE dialysiert. 10 µl der DNA wurden in elektrokompente *E. coli*-DH10B elektroporiert, unter Verwendung eines BioRad Genpulsers (2,5 kV, 25 µF, 400 Ohm). Die Transformanten wurden auf Agarplatten selektiert, die 12,5 µg/ml Chloramphenicol enthielten.

#### Beispiel 11: Isolierung von BACs und Rekonstitution von rekombinanten Viren

BACs wurden aus 100 ml Kulturen isoliert, die über Nacht bei 37°C in Gegenwart von 12,5 µg/ml Chloramphenicol angezüchtet worden waren, unter Verwendung des alkalischen Lyseverfahrens (20). Die Plasmid-DNA wurde weiter durch Präzipitation mit Polyethylenglycol gereinigt (20). Ein Zehntel der isolierten Plasmide (ungefähr 0,5 bis 1 µg) wurde zur Analyse durch Restriktionsenzymspaltung oder für eine Rekonstitution der Virusnachkommenschaft durch Calciumphosphattransfektion in MEF verwendet.

#### Beispiel 12: Metabolische Markierung und Immunopräzipitation

Eine selektive Expression von wt oder mutiertem MCMV immediate-early Proteinen wurde durch Infektion von MEF in Gegenwart von Cycloheximid (50 µg/ml) erreicht, das 3 Stunden später durch Actinomycin D (5 µg/ml) ersetzt wurde. Dann wurden Zellen mit [35S]-Methionin (1200 Ci/mmol; Amersham, Braunschweig, Deutschland) für zusätzliche 3 Stunden markiert. Die Lyse der Zellen



schweig, Deutschland) für zusätzliche 3 Stunden markiert. Die Lyse der Zellen und Immunpräzipitationen wurden durchgeführt, unter Verwendung des Antipeptidserums b5/1 (28, 16) und des Antiserums 3/1, das gegen den C-Terminus des ie1-Proteins pp89 gerichtet ist.

#### Literaturstellen:

1. Britt, W. J. & Alford, C. A. (1996) in *Fields Virology*, Hrsg. Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Lippincott-Raven, New York), S. 2493-2523.
2. Ho, M. (1991) in *Cytomegalovirus: biology and infection*, Hrsg. Ho, M. (Plenum Publishing Corp., New York).
3. Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S. Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., Martignetti, J.A., Preddie, E., Satchwell, S.C., Tomlinson, P., Weston, K.M. & Barrell, B.G. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**, 125-169.
4. Cha, T.-A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S. & Spate, R.R. (1996) *J. Virol.* **70**, 78-83.
5. Rawlinson, W.D., Farrell, H.E. & Barrell, B.G. (1996) *J. Virol.* **70**, 8833-8849.
6. Roizman, B. & Sears, A. E. (1996) in *Fields Virology*, Hrsg. Fields, B.N., Knipe, D.M. & Howley, P. M. (Lippincott-Raven, New York), S. 2231-2295.
7. Spaete, R. & Mocarski, E.S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7213-7217.
8. Manning, W.C. & Mocarski, E.S. (1988) *Virology* **167**, 477-484.
9. Vieira, J., Farrell, H.E., Rawlinson, W.D. & Mocarski, E.S. (1994) *J. Virol.* **68**, 4837-4846.
10. Wolff, D., Jahn, G. & Plachter, B. (1993) *Gene* **130**, 167-173.
11. Greaves, R.F., Brown, J.M., Vieira, J. & Mocarski, E.S. (1995) *J. Gen. Virol.* **76**, 2151-2160.
12. van Zijl, M., Quint, W., Briaire, J., de Rover, T., Gielkens, A. & Berns, A. (1988) *J. Virol.* **62**, 2191-2195.

- 13.Kemble, G., Duke, G., Winter, R. & Spaete, R. (1996) *J. Virol.* **70**, 2044-2048.
- 14.Ebeling, A., Keil, G.M., Knust, E. & Koszinowski, U.H. (1983) *J. Virol.* **47**, 421-433.
- 15.Thäle, R., Szepan, U., Hengel, H., Geginat, G., Lucin, P. & Koszinowski U.H. (1995) *J. Virol.* **69**, 6098-6105.
- 16.Messerle, M., Bühler, B, Keil, G.M. & Koszinowski. U.H. (1992) *J. Virol.* **66**, 27-36.
- 17.Mercer J.A., Marks, J.R. & Spector, D.H. (1983) *Virology* **129**, 94-106.
- 18.Hirt, B. (1967) *J. Mol. Biol.* **26**, 365-369.
- 19.Shizuya, H., Birren, B., Kim, U-J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. & Simon, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8794-8797.
- 20.Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
- 21.Chang, A. C. & Cohen, S. N. (1978). *J. Bacteriol.* **134**, 1141-56.
- 22.Sauer, B. (1993) *Methods Enzymol.* **225**, 890-900.
- 23.Keil, G.M., Ebeling-Keil, A. & Koszinowski, U.H. (1987) *J. Virol.* **56**, 526-533.
- 24.O'Connor, M., Peifer, M. & Bender, W. (1989) *Science* **244**, 1307-1312.
- 25.Kempkes, B, Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B. & Hammerschmidt, W. (1995) *J.Virol.* **69**, 231-238.
- 26.Mocarski, E. S. (1996) in *Fields Virology*, HrsgFields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Lippincott-Raven, New York), S. 2447-2492.
- 27.Pfüller, R. & Hammerschmidt, W. (1996) *J. Virol.* **70**, 3423-3431.
- 28.Del Val, M., Volkmer, H., Rothbard, J.B., Jonjic, S., Messerle, M., Schickedanz, J., Reddehase, M.J. & Koszinowski, U.H. (1988) *J. Virol.* **62**, 3965-3972.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Klonieren eines großen Virusgenoms, umfassend die Schritte
  - a) Einbringen einer Sequenz (1), enthaltend Sequenzen eines Klonierungsvehikels, in eine Zelle, enthaltend das zu klonierende Virusgenom, und
  - b) Rekombinieren der Sequenz (1) aus Schritt a) mit dem zu klonierenden Virusgenom, vorzugsweise über homologe Rekombination, so daß ein künstliches zirkuläres Chromosom entsteht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Virusgenom größer als 100 kb (vorzugsweise größer als 200 kb) ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das große Virusgenom von einem DNA-Virus stammt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die virale DNA von Herpes-Viren stammt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Herpes-Virus-DNA die DNA des menschlichen Cytomegalievirus ist.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Herpes-Virus-DNA die DNA des Maus-Cytomegalievirus ist.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zelle in Schritt a) eine eukaryontische Zelle verwendet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryontischen Zellen Säugerzellen, vorzugsweise primäre Fibroblasten, humane Vor-

hautfibroblasten (HFF), oder embryonische Fibroblasten von BALB/c-Mäusen sind.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryontischen Zellen NIH 3T3-Fibroblasten sind.

10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz (1) durch ein Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren oder Elektroporationsverfahren in die Zellen transfiziert wird.

11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz (1) aus Schritt a) von loxP-Stellen flankiert ist oder von Restriktionsschnittstellen, die im restlichen Genom nicht vorkommen.

12. Verfahren nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das erhaltene Chromosom in einem weiteren Schritt c) in E. coli eingebracht wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Einbringen in E. coli durch Elektroporation geschieht.

14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Klonierungsvehikel ein low-copy-Plasmid ist, vorzugsweise ein Mini-F-Plasmid-Derivat.

15. Künstliches zirkuläres Chromosom, erhältlich durch eines oder mehrere der in den Ansprüchen 1 bis 14 beschriebenen Verfahren.

16. Künstliches zirkuläres Chromosom nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es ein bakterielles Chromosom (BAC) ist.

17. Künstliches zirkuläres Chromosom nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß es die gesamte DNA-Sequenz eines Virus, die für die Virusvermehrung essentiell ist, sowie Sequenz (1) aus Schritt a) enthält.

18. Künstliches zirkuläres Chromosom nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es die DNA-Sequenz eines Herpes-Virus sowie Sequenz (1) aus Schritt a) enthält.

19. Künstliches zirkuläres Chromosom nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es die DNA-Sequenz des menschlichen Cytomegalievirus enthält.

20. Künstliches zirkuläres Chromosom nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es die DNA-Sequenz des Maus-Cytomegalievirus enthält.

21. Verwendung eines künstlichen zirkulären Chromosoms nach einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 20 für eine Mutagenese großer *DNA-Fragmente*.

22. Verfahren zur Mutagenese großer Virusgenome, umfassend die Schritte

A) Klonierung eines großen Virusgenoms einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14;

B) Einbringen des erhaltenen Chromosoms in eine bakterielle Wirtszelle oder Hefe; und

C) homologe Rekombination des Chromosoms mit einem mutanten Allel.

23. Zelle, enthaltend ein künstliches zirkuläres Chromosom nach einem der Ansprüche 15 bis 20.

24. Künstliches zirkuläres Chromosom nach einem der Ansprüche 15 bis 20 als Medikament, vorzugsweise als Impfstoff (somatische Gentherapie).

25. Verwendung von BAC-Plasmiden zum Klonieren großer zirkulärer DNA-Virusgenome.

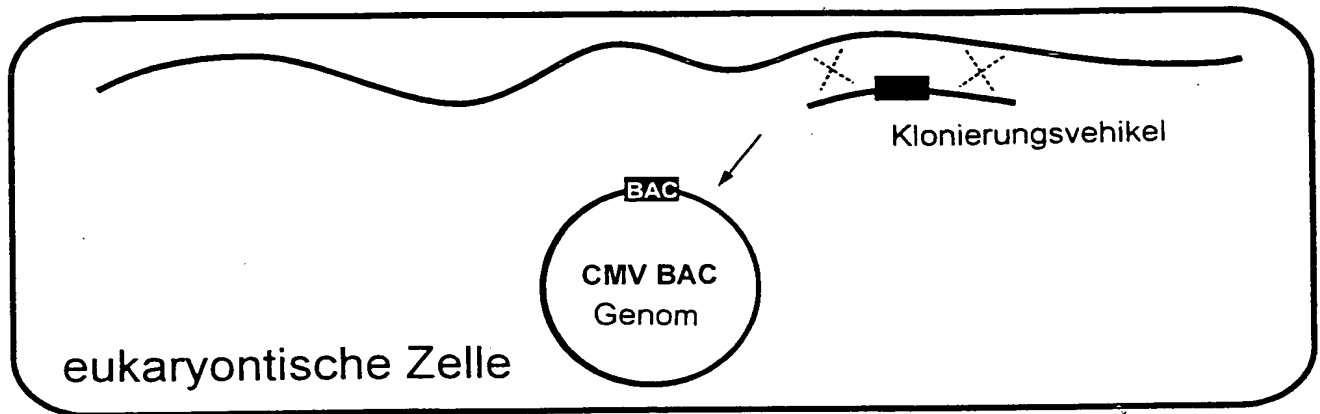
## ZUSAMMENFASSUNG

### **Verfahren zur Klonierung eines großen Virusgenoms**

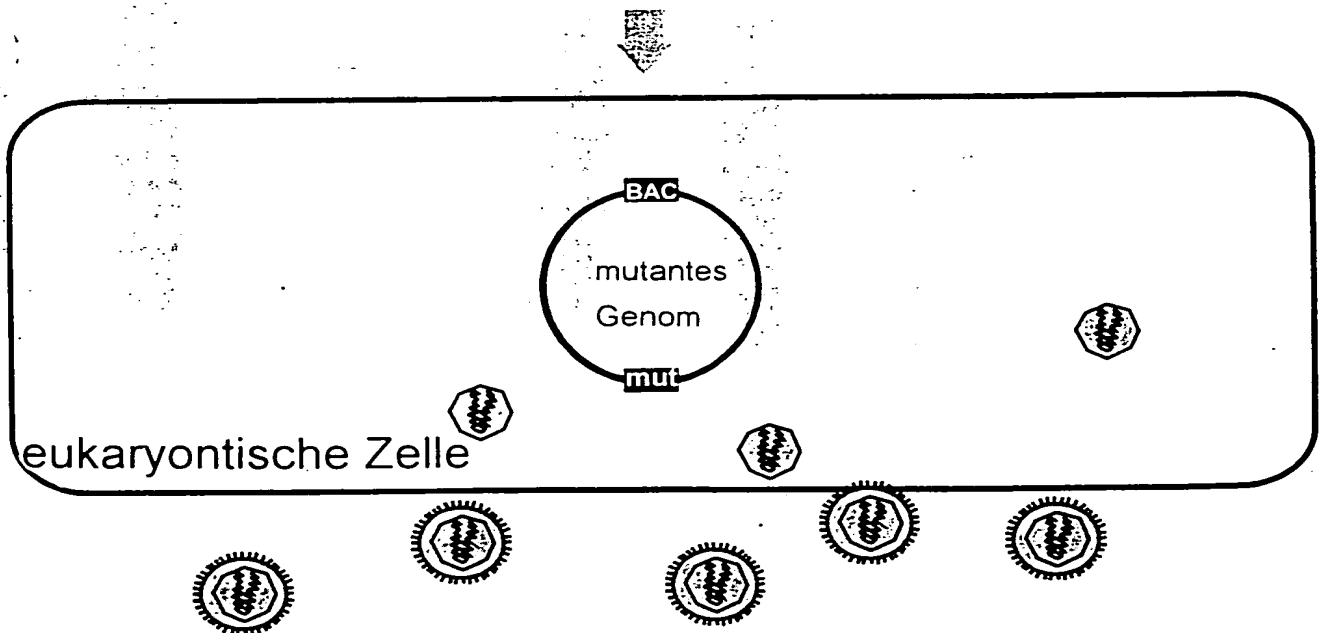
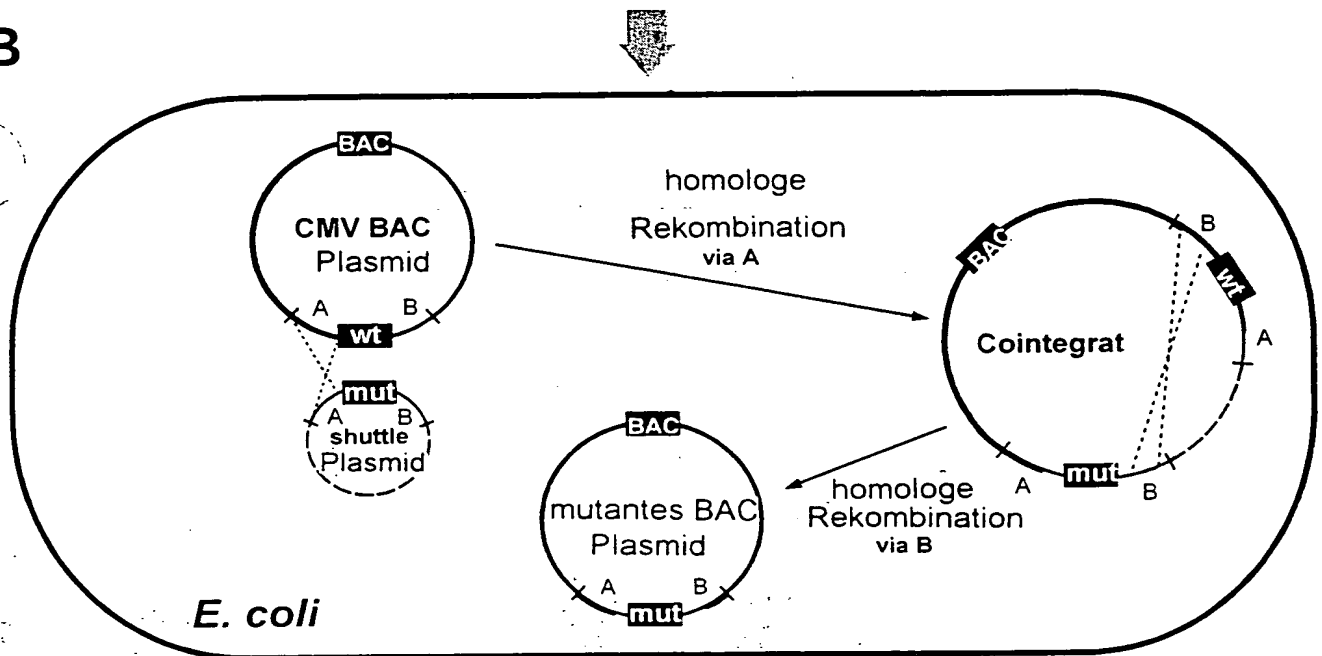
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klonierung eines großen Virus-Genoms. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein künstliches zirkuläres Chromosom, das durch ein solches Verfahren erhältlich ist, sowie seine Verwendung und ein Verfahren zur Mutagenese von großen Virusgenomen unter Verwendung des künstlichen zirkulären Chromosoms.

FIG. 1

A



B



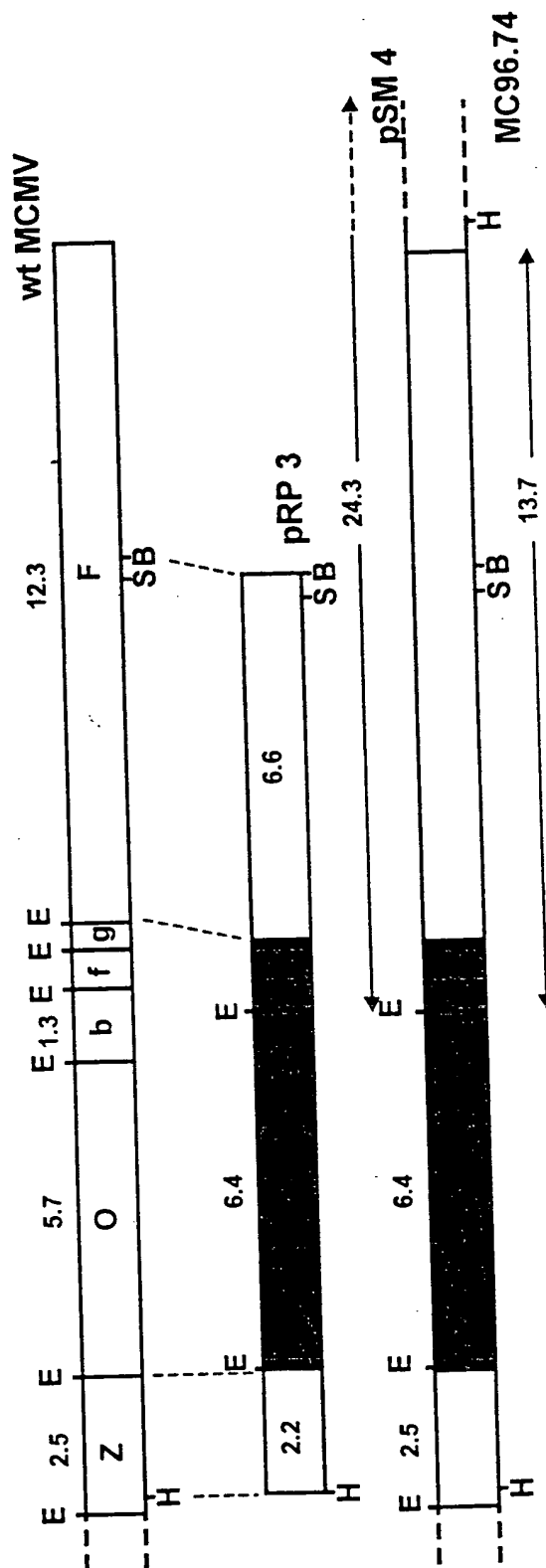
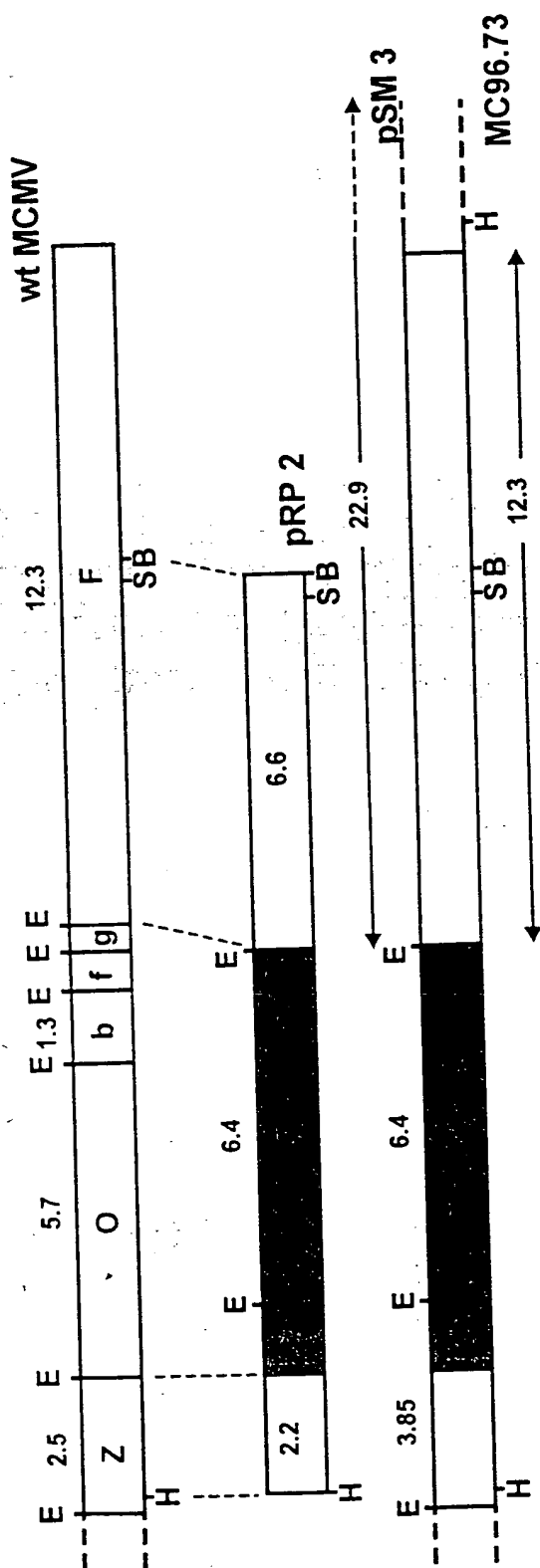


FIG. 2



FIG. 3

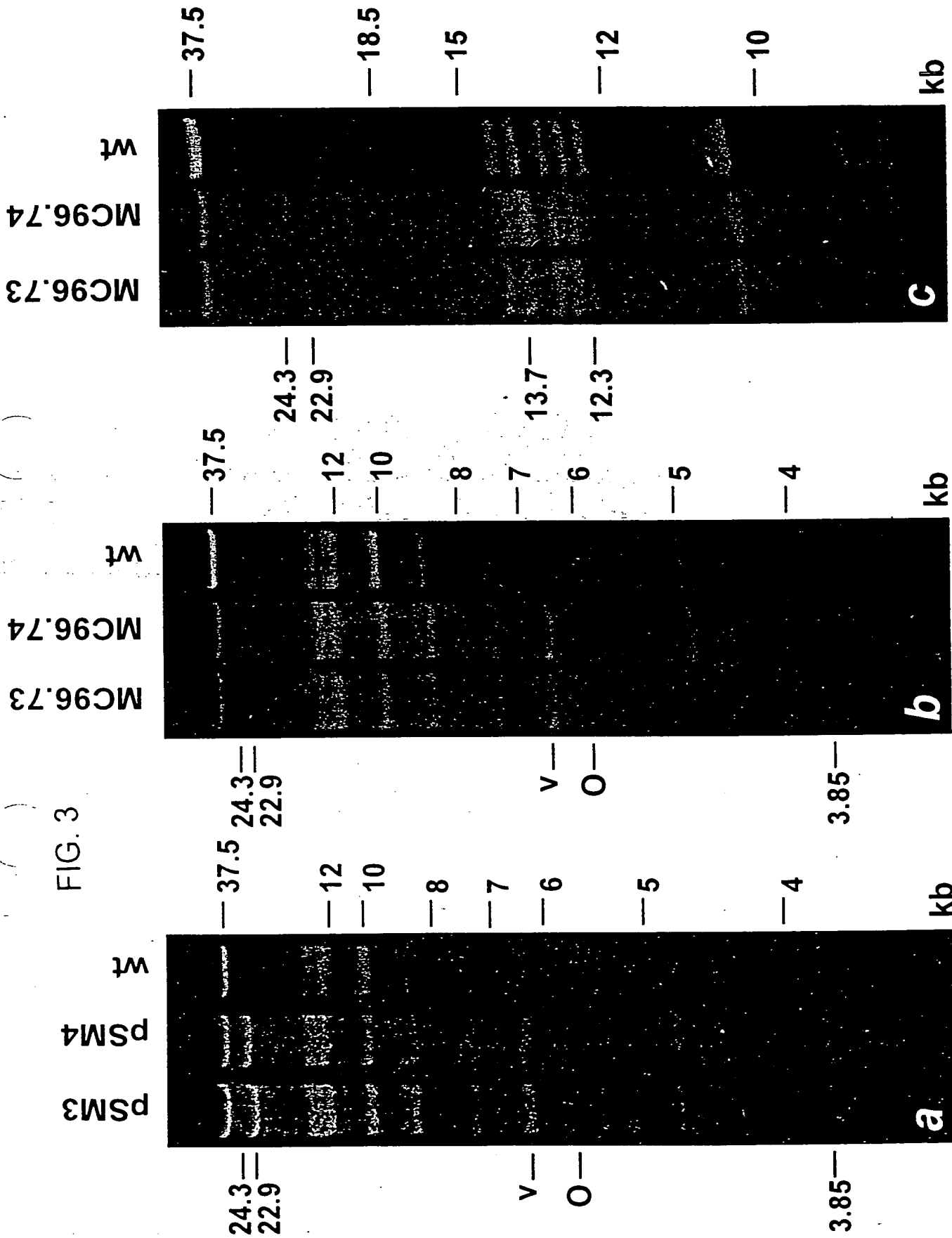


FIG. 4

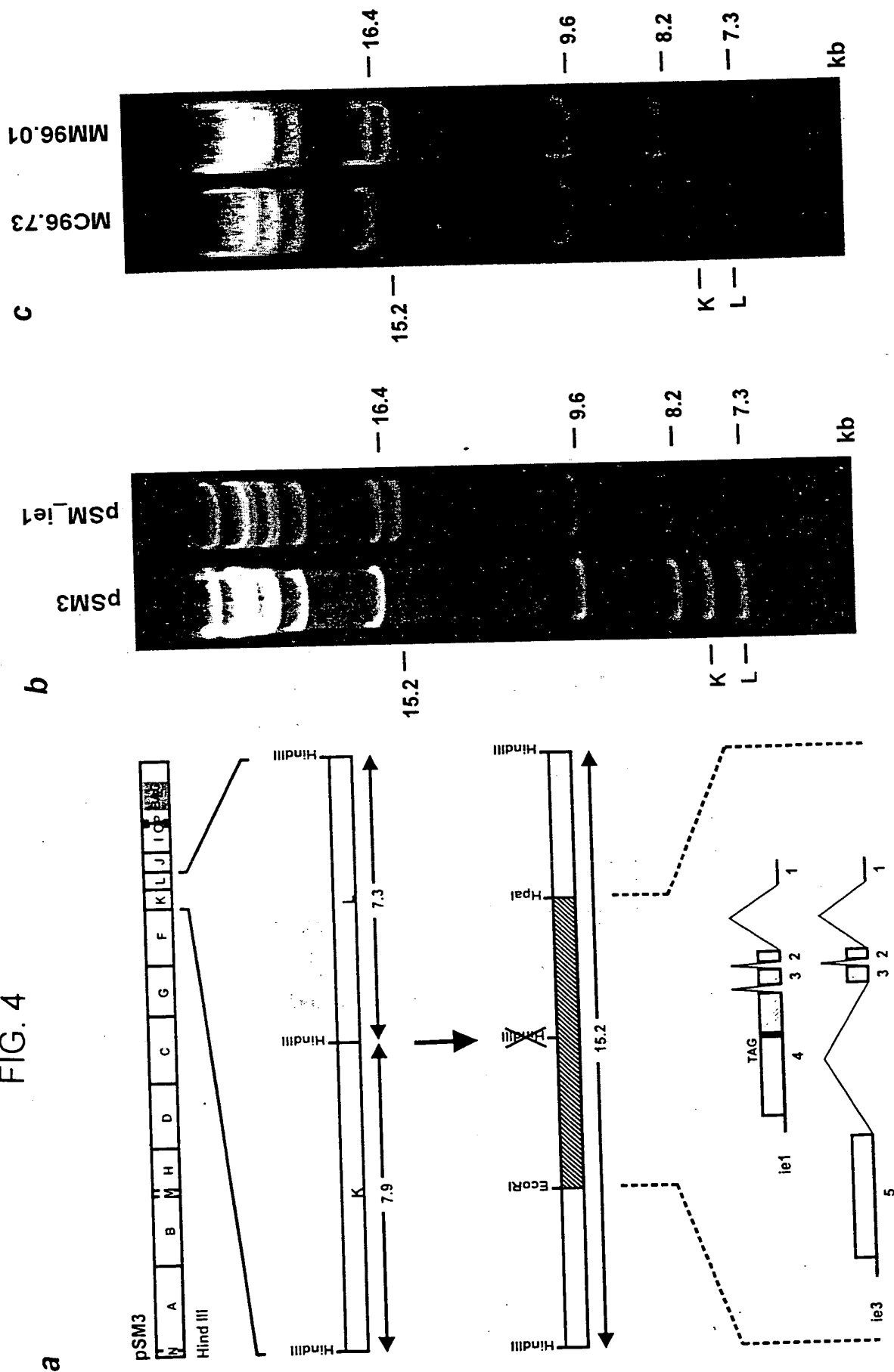
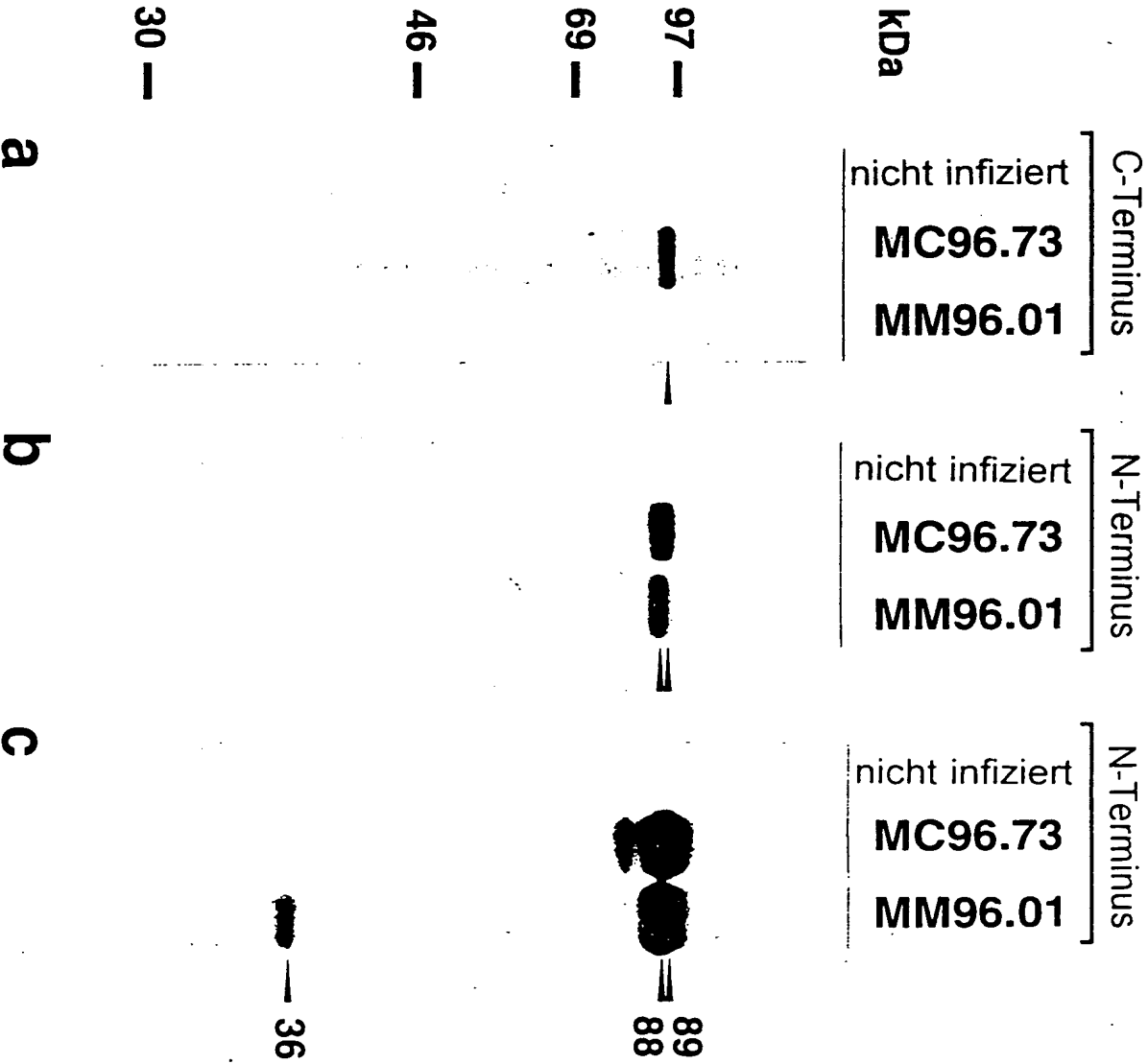


FIG. 5



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**